

非洲狼尾草未受精无孢子生殖胚囊退化研究

刘 林^{1,2}, 叶秀麟²

(1 临沂师范学院, 山东 临沂 276005; 2 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘要: 为理解植物无孢子生殖胚囊未受精条件下的退化, 对无孢子生殖植物非洲狼尾草未受精成熟胚囊中央细胞退化做了细胞形态学研究。没有受精的中央细胞退化时最显著的特点是细胞核产生核膜囊泡。核膜囊泡有两种类型: 单层膜的囊泡和双层膜的囊泡, 单层膜囊泡在细胞质中, 双层膜囊泡在细胞核内。核膜囊泡有两种发生方式: 1) 核膜的外膜向细胞质一侧膨胀产生囊泡, 囊泡进入细胞质; 2) 核膜向核内凹陷形成囊泡, 囊泡进入细胞核。核膜囊泡类型与产生方式密切关联。核膜囊泡吞噬并消化包括线粒体在内的细胞质和核质。

关键词: 胚囊退化; 核膜囊泡; 非洲狼尾草; 未受精无孢子生殖胚囊

中图分类号: Q 944 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700 (2007) 04 - 418 - 05

Study on Degeneration of Unfertilized Aposporous Embryo Sac in *Pennisetum squamulatum* (Gramineae)

LIU Lin^{1,2}, YE Xiu-Lin²

(1 Linyi Normal University, Linyi 276005, China; 2 South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: To understand the degeneration of unfertilized aposporous embryo sac in an aposporous species *Pennisetum squamulatum*, the central cell in the unfertilized embryo sac was characterized ultrastructurally. The most prominent sign of degeneration is that the central cell nucleus produced nuclear vacuoles. These nuclear vacuoles can be classified into single- and double-layered types. Single-layered nuclear vacuoles are found in the cytoplasm, while the double-layered are inside the nucleus. There are two ways to produce nuclear vacuoles. One is that the outer membrane of the nuclear envelope distends towards the cytoplasm to form nuclear vacuoles; and the other is the double-layered nuclear envelope derives vacuoles by depressing inwards. Nuclear envelope types are in relation to the ways they are produced. All nuclear vacuoles absorb cytoplasm or nuclear matrix, and trap organelles such as mitochondria.

Key words: Embryo sac degeneration; Nuclear vacuole; *Pennisetum squamulatum*; Unfertilized aposporous embryo sac

我们对未受精无孢子生殖胚囊中央细胞退化的认识以前人对细胞核形态学的研究为基础。动物或植物, 正常发育或退化的细胞中, 都可能在一定发育阶段出现细胞核产生膜囊泡的活动。动物细胞减数分裂过程中出现核膜囊泡, 这一活动与染色体联会相偶联 (Meek and Moses, 1961; Danilova and Vereiskaya, 1970; Danilova, 1973a; Rasmussen, 1976)。植物细胞减数分裂时期或配

子体发育过程中有时出现核膜囊泡 (Godward and Peristianis, 1976; Aldrich and Vasil, 1970; Sheffield等, 1979)。细胞程序性死亡过程中常出现核膜囊泡, 如导管分子成熟是程序性死亡过程 (王雅清等, 1998), 胚珠内胚囊周围的珠心细胞随着胚囊发育发生程序性死亡 (刘林等, 2001), 这些程序性死亡过程中的细胞, 其细胞核产生核膜囊泡的活动非常明显。

无孢子生殖植物胚的发育需要假受精作用：卵细胞不受精而独立发育成胚，但胚的发育以胚乳发育为先决条件，而胚乳是中央细胞受精后的产物；没有受精作用，中央细胞退化（Nogler, 1984; Nogler, 1975, 1982）。

非洲狼尾草进行无孢子生殖，成熟无孢子生殖胚囊含一个卵、一个助细胞和一个双极核中央细胞；胚发育不需要受精，但需要胚乳，而胚乳发育需要受精（温沁山等, 1998）。人工控制不让授粉，胚囊退化，不能结实。中央细胞退化因没有受精，卵细胞退化因没有胚乳提供营养。由此产生的中央细胞退化是程序性死亡，本文报导非洲狼尾草中央

细胞程序性死亡过程中细胞核产生囊泡的活动。

1 材料与方法

非洲狼尾草（*Pennisetum squamulatum* Fresen）试材系从美国农业部农业服务中心海岸平原实验站（USDA = ARS, Coastal Plain Station, Tifton, GA31793, USA）引种，种植于华南植物园试验田。

标记一组小花，于开花前3 d去雄，去雄后套袋，避免小花授粉。从花前1 d到花后1 d，取小花，分离出子房。将子房顶部切去，然后置入2%戊二醛溶液（0.1 mol/L磷酸缓冲液配制，pH6.8）于室温下初固定12 h。然后用1%钨酸（0.1 mol/L磷酸缓冲液配制，pH6.8）在4℃温度下再固定12 h。梯度酒精脱水，Epon-812包埋。先做2

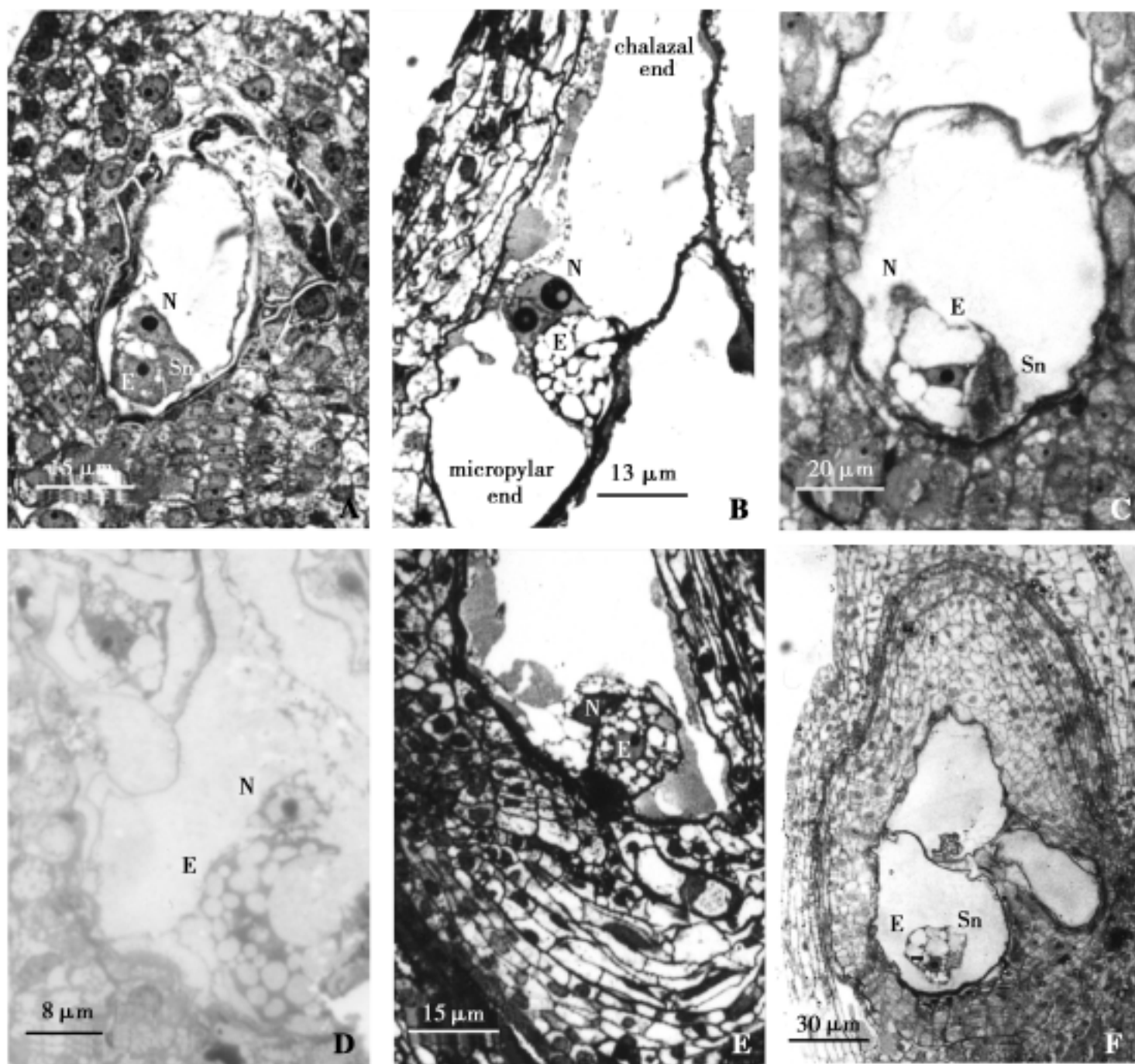


图1 非洲狼尾草无孢子生殖胚囊

A. 花前1 d, 示成熟胚囊含卵 (E)、助细胞 (Sn) 和极核 (N); B. 开花当天, 示合点端成熟胚囊含卵 (E)、两个极核 (N); C~E. 开花当天, 示珠孔端胚囊胚囊成员次生核 (N)、卵 (E) 或助细胞 (Sn); F. 花后1 d, 示珠孔端胚囊中卵 (E) 和助细胞 (Sn), 中央细胞核已经退化。

Fig. 1 Aposporous embryo sacs in *Pennisetum squamulatum* at anthesis

A. 1 day before anthesis, showing a mature embryo sac consisting of an egg (E), a synergid (Sn) and polar nuclei (N); B. At anthesis, showing egg cell (E) and polar nuclei (N) in an embryo sac at chalazal end; C-E. At anthesis, showing egg (E), synergid (Sn), or secondary nucleus (N) in embryo sac near micropylar end; F. 1 day after anthesis, showing egg (E), synergid (Sn) and disappearance of polar nucleus in the embryo sac near micropylar end.

~ 3 μm 半薄切片，甲苯胺蓝染色，光镜下观察照相。对开花当天的材料，做 80 nm 超薄切片，醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染，JEM-1010 透射电子显微镜下观察并照相。

2 实验结果

非洲狼尾草具多个无孢子生殖原始细胞，发育多个无孢子生殖胚囊，通常情况下，总是最接近珠孔端的一个发育占优势。光镜观察，花前 1 d，最靠近珠孔端的胚囊成熟，含一个卵细胞、一个助细胞和两个极核（图 1：A）。开花当天，除个别不靠近珠孔端的胚囊也发育成熟，含两个极核（图 1：B），最靠近珠孔端胚囊的两个极核已经融合成次生核（图 1：C~ E）。花后 1 d，中央细胞次生核退化，有些胚囊中次生核完全解体（图 1：F）。

电镜观察，开花当天未受精成熟胚囊中卵细胞高度液泡化，细胞质主要分布在细胞核周围，细胞核具平滑核膜，核质均匀，核质内有染色质分布；细胞质含大量质体、线粒体、内质网等细胞器，表明卵是代谢活跃的细胞（图 2）。显然，开花当天非洲狼尾草无孢子生殖胚囊即使不受精，卵细胞也没有退化迹象。

开花当天未受精无孢子生殖胚囊中，中央细胞有丰富的质体、线粒体、高尔基体等细胞器（图 3：A ~ D），表明细胞质代谢旺盛；但是细胞核开始出现不正常形态变化，核膜产生核囊泡。核膜囊泡具双层膜或单层膜。核内膜和外膜分开，外膜向细胞质膨胀，产生具单层膜的囊泡（图 3：A ~ C），这种囊泡与细胞质中的小泡类似（图 3：C），显示细胞质中小泡由核膜活动产生；完整的核膜向核内凹陷而产生具双层膜的囊泡（图 3：B ~ E）。值得注意的是，双层膜的核膜囊泡只向核内侧产生，单层膜的囊泡只向细胞质一侧发生。核膜囊泡产生时吞噬细胞质，包括线粒体等细胞器（图 3：C ~ E）；进入核内的囊泡继续吞噬核基质。细胞质基质、线粒体、核基质等在核囊泡内逐渐消化。

3 讨论

植物无孢子生殖方式的显著特点之一是：卵细胞不受精直接发育成胚，中央细胞受精后才能发育成胚乳；没有受精作用，中央细胞退化，进而卵细胞退化，最终不能结实（Nogler, 1984；

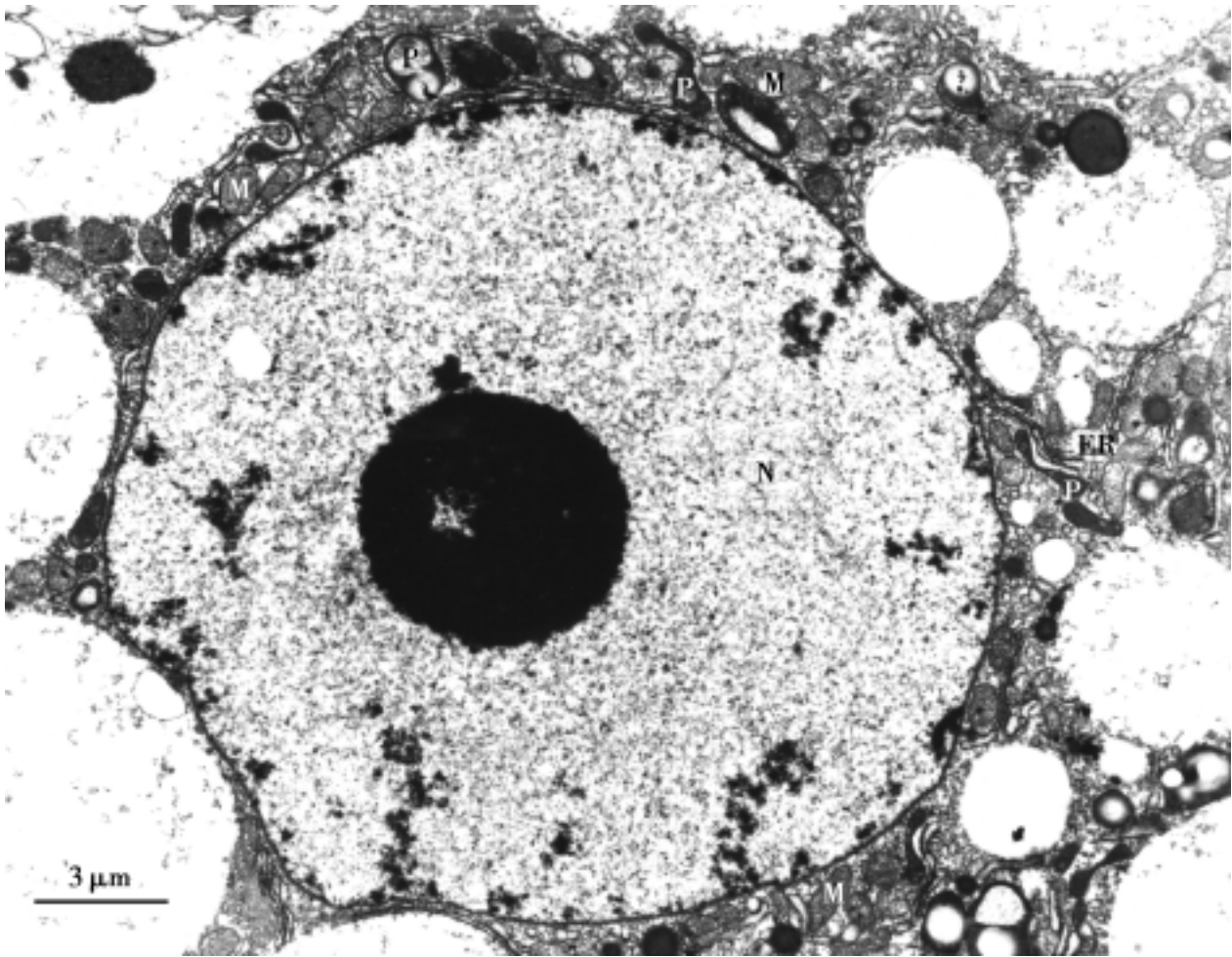


图 2 非洲狼尾草开花当天未受精成熟无孢子生殖胚囊中的卵细胞
N: 示卵细胞核；M: 周围细胞质中的线粒体；P: 质体；ER: 内质网

Fig . 2 Egg cell of unfertilized aposporous embryo sac in *Pennisetum squamulatum* at anthesis
N: nucleus; M: mitochondria; P: plastids; ER: endoplasmic reticula .

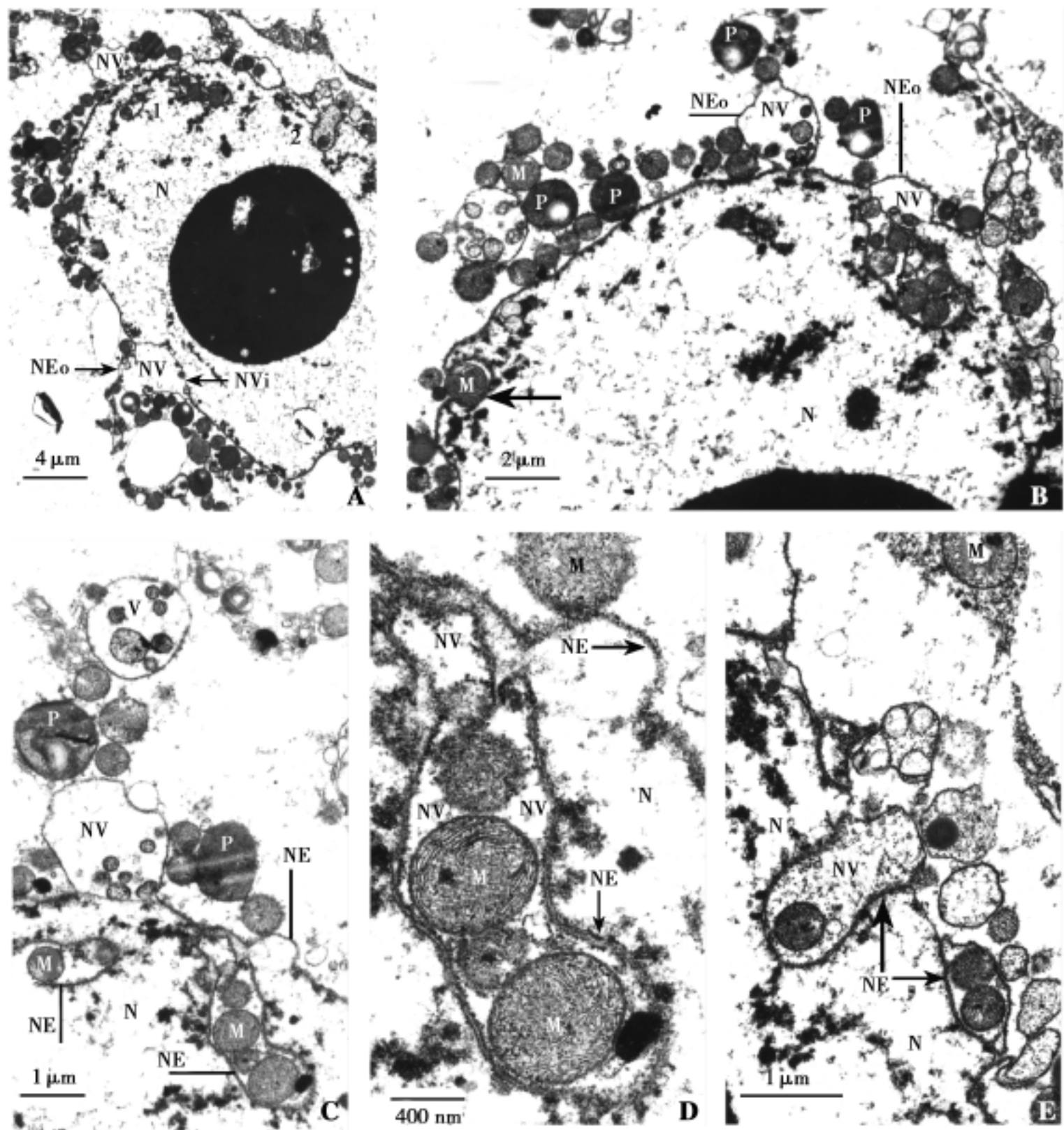


图3 非洲狼尾草开花当天未受精无孢子生殖胚囊中央细胞产生核膜囊泡

A. 核外膜 (NEo) 与内膜 (NVi) 分开形成囊泡 (NV); B. 核外膜 (NEo) 产生囊泡 (NV), 完整核膜内陷并吞噬线粒体 (箭号), 核 (N) 附近有线粒体 (M)、质体 (P) 等细胞器; C. 图 3A 数字 1 所示位置, 核外膜产生的囊泡 (NV) 和细胞质中的囊泡 (V) 类似。核 (N) 内的囊泡 (NV) 有线粒体 (M), 核周围有质体 (P)。D. 图 3C 一个核内部囊泡 (NV) 放大, 示双层膜和所含线粒体 (M)。E. 图 3A 数字 2 所示位置, 示发育中的囊泡 (NV) 和所吞噬线粒体 (M)。注意核 (N) 和核膜 (NE)

Fig. 3 Nuclear vacuoles production from central cell of unfertilized aposporous embryo sac in *Pennisetum squamulatum* at anthesis

A. Outer and inner membranes (NEo, NVi) separate, producing nuclear vacuoles (NV); B. Showing nuclear vacuoles (NV). A nuclear vacuole formation just begins (arrow); C. Highlighting similarity between vesicles (V) in cytoplasm and outer membrane-derived nuclear vacuole (NV) in area marked as 1 in A. Mitochondria (M) are in nuclear vacuoles; D. Highlighting a two membrane-bounded nuclear vacuole (NV) shown in C; E. Highlighting development of a two membrane-bounded nuclear vacuole (NV) marked with 2 in A. Note nucleus (N), nuclear envelope (NE), out membrane (NEo), mitochondria (M), and plastids (P).

Nogler, 1975, 1982)。在通过人工控制而不受精的条件下, 非洲狼尾草无孢子生殖胚囊的中央细胞退化时, 卵细胞依然正常, 表明受精对中央细胞向胚乳发育的重要性。中央细胞退化后, 卵细

胞还能生存一段时间, 但最终还要退化。中央细胞的退化是程序性死亡过程。

中央细胞退化时, 细胞核产生大量核膜囊泡。按照囊泡的膜结构, 可将囊泡分成两种类型: 一

种具有单层膜, 另一种具双层膜。核膜囊泡产生有两种方式: 一种方式是核膜的外膜向外膨胀, 进而形成囊泡并脱离细胞核进入细胞质; 另一种方式是核膜向内凹陷形成囊泡, 囊泡最终脱离核膜游离于细胞核内。核膜囊泡的类型与产生方式有密切联系, 向外膨胀产生的囊泡具单层膜, 向核内凹陷产生的囊泡具双层膜。同时具有两种产生核膜囊泡的方式, 产生两种类型的核膜囊泡, 是非洲狼尾草无孢子生殖胚囊中央细胞所具有的特点。正常发育的细胞, 核膜的内膜向核内产生单层膜的囊泡 (Sheffield 等, 1979), 或者核膜的外膜向核外产生单层膜的囊泡 (Aldrich and Vasil, 1970; Godward and Peristianis, 1976)。程序性死亡中的细胞, 通常是核膜的外膜向外膨胀产生单层膜的囊泡 (王雅清等, 1998; 刘林等, 2001)。

正常减数分裂细胞产生核膜囊泡与染色体联会后再分布有关 (Meek and Moses, 1961; Danilova and Vereiskaya, 1970; Danilova, 1973 a, b; Rasmussen, 1976; Sheffield 等, 1979), 细胞核没有因为产生囊泡的活动而解体。非洲狼尾草程序性死亡的中央细胞产生核膜囊泡与细胞质和核解体有密切联系。核膜囊泡都吞噬细胞质, 包括线粒体这样的细胞器, 进入囊泡中的细胞质和细胞器被降解, 结果细胞结构破坏, 功能丧失, 因而核膜囊泡产生促进中央细胞迅速解体。珠心细胞和导管分子的核膜囊泡都不吞噬线粒体这样的大型细胞器, 而中央细胞的核膜囊泡吞噬线粒体这种大的细胞器, 可能与细胞死亡速度有关。珠心细胞解体的产物被发育中的胚囊或胚与胚乳所利用, 导管分子细胞质解体的产物可作为次生壁生长的原料, 显然这些细胞程序性死亡与其它生物学过程有密切的偶联, 缓慢进行则与其它发育过程相适应; 而非洲狼尾无孢子生殖胚囊中央细胞解体没有与之相偶联的发育过程, 对其它生物学过程没有贡献, 也许这与选择快速解体有关?

〔参 考 文 献〕

- Aldrich HC, Vasil IK, 1970 . Ultrastructure of the postmeiotic nuclear envelope in microspores of *Podocarpus macrophyllus* [J] . *J Ultrastruct Res*, **32**: 307—315
- Danilova LV, 1973a . Electron microscopic study of meiosis in diploid male silkworms [J] . *Ontogenez*, **4**: 40—48
- Danilova LV, 1973b . An electron microscope study of meiosis in oligopyrene spermatocytes of the silkworm [J] . *Ontogenez*, **4**: 281—287
- Danilova LV, Vereiskaya VN, 1970 . Lamellar bodies in spermatogenesis in the silkworm *Bombyx mori* [J] . *Ontogenez*, **1**: 360—367
- Godward MBE, Peristianis GC, 1976 . An electron microscope autoradiographic investigation of the uptake of [^3H] thymidine into the pachytene nucleus [A] . In *Current Chromosome Research*, Jones K, Brandham PE, eds (North Holland: Elsevier), 327—338
- Liu L (刘林), Ye XL (叶秀麟), Liang CY (梁承邨), 2001 . Ultrastructural observation on programmed cell death of nucellus in *Pennisetum squamulatum* [J] . *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), **9** (2): 136—141
- Meek GA, Moses MJ, 1961 . Microtubulation of the inner membrane of the nuclear envelope [J] . *J Biophys Biochem Cytol*, **10**: 121—131
- Nogler GA, 1975 . Genetics of apospory in *Ramunculus auriconus* . IV . Embryology of F3 and F4 backcross offspring [J] . *Phytomorphology*, **25**: 485—490
- Nogler GA, 1982 . How to obtain diploid apomictic *Ramunculus auricomus* plants not found in the wild state [J] . *Bot Helv*, **92**: 13—22
- Nogler GA, 1984 . Gametophytic apomixis [A] . In *Embryology of Angiosperms*, Johri BM, ed (Berlin: Springer-Verlag), 475—518
- Rasmussen SW, 1976 . The meiotic prophase in *Bombyx mori* females analysed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes [J] . *Chromosoma*, **54**: 245—293
- Sheffield E, Cawood AH, Bell PR *et al* . 1979 . The development of nuclear vacuoles during meiosis in plants [J] . *Planta*, **146**: 597—601
- Wang YQ (王雅清), Cui KM (催克明), 1998 . Programmed cell death during the vessel element differentiation of the secondary xylem in *Eucommia ulmoides* shoots [J] . *Acta Bot Sin* (植物学报), **40** (12): 1102—1107
- Wen XS (温沁山), Ye XL (叶秀麟), Li YQ (黎垣庆) *et al* . 1998 . Embryological studies on apomixis in *Pennisetum squamulatum* [J] . *Acta Bot Sin* (植物学报), **40** (7): 598—604